



Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina

CENTRO HOSPITALAR
LISBOA NORTE, EPE



Complicações da infecção por EBV em doentes transplantados

Maria Silva Pinto Ribeiro da Cunha

Orientação Científica: Dr. Tiago Marques
Clínica Universitária de Doenças Infecciosas
Directora: Prof. Doutora Emília Valadas
Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina
Ano Lectivo 2015/2016

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, no contexto do curso de Mestrado Integrado em Medicina, realizada sob orientação científica do Dr. Tiago Marques, *Assistente Convidado de Infeciologia na Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, cuja directora é a Prof. Doutora Emília Valadas.*

Agradecimentos

Expresso a minha gratidão a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho:

Ao Doutor Tiago Marques, por todo o apoio, disponibilidade e paciência em rever incontáveis versões do texto.

À Prof. Doutora Emília Valadas, pela ajuda que me deu em relação à formatação e aspectos práticos do trabalho.

Ao Hugo Caldeira, pelas dicas, ajudas e artigos que se esforçou por encontrar.

Índice

Lista de Abreviaturas	5
Resumo.....	6
Abstract	6
Métodos.....	6
Introdução	7
Linfomagenese mediada por EBV	8
Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante (PTLD).....	9
Tipos de agentes imunossupressores relacionados com PTLD	10
Factores de Risco para o desenvolvimento de PTLD	12
Manifestações.....	14
Exames complementares de diagnóstico	15
Rastreio de PTLD em doentes susceptíveis	17
Terapêutica Preventiva.....	19
Tratamento	21
Prognóstico.....	26
Conclusão.....	27
Tabelas	Error! Bookmark not defined.
Referências Bibliográficas	30

Lista de Abreviaturas

ATG – *Anti-Thymocyte Globulin* (Globulina Anti-Timócito)
Bcl-6 – *B-cell lymphoma protein*
BUN – *Blood Urea Nitrogen*
CMV – Citomegalovírus
CTL-EBV – *Cytotoxic T lymphocytes against Epstein-Barr Virus*
(Linfócitos T citotóxicos contra EBV)
DECH – Doença do Enxerto contra Hospedeiro
EBER – *Epstein-Barr virus-encoded small RNAs*
EBNA – *EBV-Nuclear Antigen*
EBV – *Epstein-Barr virus*
E.C.O.G. - *Eastern Cooperative Oncology Group*
FDG-PET – *Fluorodeoxyglucose- Positron Emission Tomography*
HLA – *Human Leukocyte Antigen*
IFN – Interferão
LDH – Lactato Desidrogenase
LMP – *Latent Membrane Protein*
MHC – *Major Histocompatibility Complex*
m-TOR – *Mechanistic Target of Rapamycin*
OKT3 – *Orthoclone 3*
O.M.S. - Organização Mundial da Saúde
PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Células Mononucleadas do Sangue Periférico)
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PTLD – *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders* (Doenças Linfoproliferativas Pós-Transplante)
R-CHOP – Rituximab+Ciclofosfamida+Hidroxicortisona+Oncovina (Sulfato de Vincristina)+Prednisona
RI – Redução da Imunossupressão
RM – Ressonância Magnética
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC – Sistema Nervoso Central
TC – Tomografia Computorizada
TCEH – Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas
TOS – Transplante de Órgão Sólido
VHC – Vírus da Hepatite C

Resumo

Paralelamente à crescente utilização de transplantes de órgão sólido ou de células estaminais no tratamento de uma miríade de doenças, tem crescido a investigação de patologias relacionadas com a imunossupressão associada. As doenças linfoproliferativas pós-transplante (PTLD, do inglês post-transplant lymphoproliferative disorders), frequentemente associadas à reactivação do vírus de Epstein-Barr nestes doentes, podem representar uma complicação grave da imunossupressão. Nesta revisão pretende-se sumarizar o mecanismo de desenvolvimento destas patologias, apresentar as classificações, enumerar os factores de risco, assim como os sinais e sintomas de apresentação de PTLD. Para orientação clínica, expõem-se ainda os exames complementares de diagnóstico úteis para o seu rastreio e monitorização, terminando por discutir os principais esquemas terapêuticos usados com intenção preventiva ou curativa, segundo as *guidelines* mais actuais.

Abstract

The rising usage of solid organ transplants and stem cell transplant in the treatment of various diseases has been accompanied by a growing research into the consequences of the associated immunosuppression. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD), frequently linked to the reactivation of the Epstein-Barr virus, may represent a serious complication of immunosuppression. This review summarizes the mechanism inherent to the development of these disorders, describes their current classification system, lists the risk factors and the signs and symptoms associated with PTLD. To guide the clinical approach to these disorders, this review scrutinizes the most important diagnostic tests for screening and monitoring the development of PTLD, and also discusses the main therapeutic approach to prevention or cure, according to the most recent guidelines.

Keywords: PTLD, Post-transplant Lymphoproliferative Disorders, EBV, classification, risk factors, treatment, screening, prevention.

Métodos

Pesquisa do PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) de artigos na língua inglesa, entre 1999 e 2015, recorrendo às palavras-chave: “EBV”, “Epstein-Barr Virus”, “EBV+PTLD”, “PTLD prevention,” “PTLD treatment,” “PTLD prognosis” e artigos referenciados na bibliografia destes. Consulta do capítulo 141: Epstein Barr virus (infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus-associated malignant diseases, and other diseases) do livro *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 8ª edição da Elsevier/Saunders.

Introdução

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus de DNA de cadeia dupla da família γ -herpesviridae que infecta principalmente linfócitos B e células epiteliais. É um vírus ubíquo, presente em cerca de 90% da população mundial, atingindo altas concentrações na saliva de indivíduos infectados, através da qual ocorre a transmissão. A maioria dos indivíduos contrai infecção por EBV durante a adolescência, e cerca de metade vem a desenvolver mononucleose infecciosa, que é maioritariamente uma patologia autolimitada, embora possa ter raras complicações. No entanto, a infecção crónica pode associar-se ao desenvolvimento de doenças malignas, tais como neoplasias malignas de linhagem B ou células epiteliais da orofaringe.¹

Existem várias formas pelas quais EBV é capaz de iludir o sistema imunitário e assegurar a sua persistência nos linfócitos B, das quais a mais relevante é o desenvolvimento de padrões de latência. Após a fase aguda de infecção com replicação lítica, o vírus tem a capacidade de alterar a sua expressão genética, produzindo apenas proteínas pouco imunogénicas, capazes no entanto de promover a transformação tumoral. A mais importante destas proteínas é a EBV *nuclear antigen 1* (EBNA-1), imprescindível para a replicação do genoma e regulação da transcrição de genes virais.^{2,3} Outras proteínas contribuem para a transformação maligna: EBNA-2 contribui para a imortalização celular e LMP-1 possui a capacidade de induzir factores de crescimento, invasão e metástase.

Ainda, a produção de EBV-*encoded small RNAs* (EBERs) contribui para a capacidade de crescimento e formação tumoral, e de resistência a apoptose induzida por interferão- α (INF- α).³

Baseando-se no padrão de expressão dos genes de latência, descrevem-se três tipos de infecção latente, associados a diferentes linfomas:

Latência I – está mais frequentemente associada a linfoma de Burkitt. Define-se pela expressão de EBER e EBNA1;⁴

Latência II – relacionada com linfoma de Hodgkin e carcinoma nasofaríngeo. Caracteriza-se pela expressão de EBER, EBNA1, LMP1, LMP2;⁴

Latência III – Este padrão é expresso na maioria de linfomas não-Hodgkin ligados a SIDA e doenças linfoproliferativas pós-transplante. Consiste na expressão de EBER, todos os EBNAs, LMP1 e LMP2;⁵

Linfomagéneze mediada por EBV

Os padrões de latência II e III são oncogénicos tanto em células epiteliais como em linfócitos B. No entanto, estes padrões de expressão de EBV provocam uma reacção imunitária visto que as proteínas EBNA, com a excepção de EBNA-1, que tem a capacidade de inibir a apresentação através do MHC I, são imunogénicas. Em indivíduos imunocompetentes, os linfócitos B em latência III são eliminados pelo sistema imunitário. No caso de linfomas pós-transplante, a imunossupressão direccionada a evitar reacção contra o transplante permite a proliferação de linfócitos B em fase de latência III, que, com o tempo, adquirem mais alterações tais como sobreexpressão e mutação de Bcl-6, inactivação do p53, e indução da actividade da telomerase, contribuindo para o processo de transformação tumoral.^{2,6}

Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante

Estudos de PTLD, do inglês *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders* em receptores de transplante de órgão sólido (especialmente coração, rim e pulmão) demonstram que a maioria destas lesões pode ser categorizada em quatro categorias distintas baseado na morfologia e critérios genéticos, que se relacionam com o comportamento e progressão da doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.), a classificação é a seguinte:

1. Lesões precoces: A maioria desenvolve-se durante o primeiro ano pós-transplante e inclui dois tipos: hiperplasia de plasmócitos e lesões tipo mononucleose. Estas lesões envolvem sobretudo as amígdalas, adenoides e gânglios linfáticos. Não invadem nem afectam a arquitectura do tecido afectado e não costumam apresentar alterações citogénicas. Estas lesões tendem a regredir espontaneamente ou após redução da imunossupressão, embora uma minoria possa ser fatal. ⁷

2. PTLD polimórfica: Afecta tecidos ganglionares e extraganglionares, demonstrando perda da arquitectura tecidual e necrose. É composto por uma população de imunoblastos, plasmócitos, linfócitos B em vários estádios de diferenciação, assim como algumas células Reed Sternberg-like semelhantes às do linfoma de Hodgkin. A maioria destas lesões apresenta um padrão de latência tipo II ou III (com expressão de EBER, LMP-1 e expressão variável de EBNA-2 e outros antígenos virais). Alguns podem regredir em resposta a redução da imunossupressão enquanto outros podem progredir e necessitar de quimioterapia. ⁷

3. PTLD monomórfica: Contém células citologicamente malignas. A maioria tem origem em linfócitos B, embora possa também surgir da linhagem T e assemelham-se a casos típicos de linfoma não-Hodgkin em doentes imunocompetentes. Causam distorção da arquitectura dos tecidos e localizam-se sobretudo em locais extra-tonsilares, invadindo órgãos à distância. ⁸ Contém várias alterações genéticas, incluindo alterações em oncogenes e genes supressores de tumores como p53, RAS e myc. ⁹ Salienta-se que

crianças (devido a um maior índice de seronegatividade) e recipientes de transplantes pulmonares ou cardio-pulmonares (devido à abundância linfática deste órgão e à importação de altos níveis de EBV do dador) estão em maior risco para manifestação precoce de PTLD monomórfica.^{8, 10}

4. Linfoma de Hodgkin clássico: Diagnosticado de acordo com os mesmos critérios em doentes imunocompetentes. Apresentam células de Reed-Sternberg assim como um infiltrado contendo pequenos linfócitos, histiócitos, plasmócitos, alguns eosinófilos e neutrófilos.⁷ Estes linfomas pertencem ao grupo de PTLDs monomórficas; no entanto, devido às suas características clínicas e histológicas particulares, representam um grupo à parte na classificação da OMS.¹¹

É importante mencionar que existe PTLD EBV-negativa, que possui características distintas, tais como um maior tempo de latência e apresentação histológica maioritariamente monomórfica. Este tipo de doença não está associado a menor resposta à terapêutica inicial e a probabilidade de remissão completa não difere da EBV-positiva.¹²

Tipos de agentes imunossupressores relacionados com PTLD

A depleção de linfócitos T é o maior factor de risco para o desenvolvimento de PTLD, no entanto, o uso de métodos que resultem numa perda equilibrada de linfócitos T e B não está associado a um aumento do risco. O efeito protector da depleção dos linfócitos B deve-se à diminuição do número de linfócitos infectados e da eliminação de linfócitos com o potencial de transformação oncológica.¹³

Recentemente, tem havido uma tentativa de identificar quais os agentes imunossupressores mais relacionados com a ocorrência de PTLD e quais os que possam ter efeito protector. Embora seja difícil identificar o papel de um só agente, visto que predominam as terapêuticas combinadas, chegou-se à conclusão de que a globulina antitimócito (ATG), muromonab-CD3 (nome comercial Orthoclone OKT3) assim como

inibidores da calcineurina (ciclosporina, tacrolimus), fludarabina, azatioprina e outros agentes que provoquem uma profunda supressão dos linfócitos T estão associados a um maior risco de PTLT. ^{14, 15, 16, 17}

Devido à importância de manter uma imunossupressão adequada com vista a evitar rejeição do enxerto ou a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), tem sido feito um esforço de procurar agentes que possam desempenhar o papel desejado sem aumentar o risco de PTLT.

Registou-se em vários estudos a ocorrência de uma redução significativa da carga de EBV em doentes a quem é administrado micofenolato de mofetil em comparação com outros agentes, o que foi atribuído ao seu efeito anti-B, reduzindo a população de linfócitos B portadores do vírus. ¹⁸

Inibidores do m-TOR, nomeadamente a rapamicina, parecem ter também um efeito inibitório sobre as células tumorais associadas a EBV, bloqueando a replicação de linfócitos afectados por este vírus, causando uma inibição directa do crescimento de linfomas B relacionados com EBV em doses que permitem prevenir a rejeição do enxerto. ^{19, 20}

Um estudo recente por Kanakry *et al.* sobre o uso de ciclofosfamida em altas doses como prevenção de DECH revelou zero casos de PTLT no primeiro ano, com baixa incidência nos meses seguintes. ²¹ Embora seja necessária uma maior continuidade de vigilância, estes resultados parecem promissores.

Factores de Risco para o desenvolvimento de PTLD

Frequency of PTLD in different types of transplants.

Organ transplanted	Reported risk of developing PTLD %
Kidney	1%
Liver	2–5%
Heart	2–5%
Lung	1.8–7.9%
Heart-lung	9.4%
Small bowel	up to 30%
Pancreas	2.1%
Bone marrow	<1%

Fig. 1 – Frequência de PTLD em diferentes tipos de transplante.⁷

Como se pode constatar na imagem acima (Fig.1), a incidência de PTLD depende do tipo de transplante; verificou-se que um risco maior surge em receptores de transplante de intestino delgado (onde pode chegar a atingir os 30%), um risco intermédio em recipientes de transplante pulmonar ou cardio-pulmonar (podendo atingir até cerca de 10% dos doentes transplantados), e um baixo risco em receptores de transplante renal, hepático, cardíaco e pancreático (até 5%). O desenvolvimento de PTLD no âmbito de um transplante de medula óssea é raro (menos de 1%).

Para além do tipo de transplante realizado, existem outros factores de risco identificados:

- **Transplante de Órgão Sólido (TOS):**
 - Os factores de risco mais significativos incluem: seronegatividade para EBV na altura do transplante, idade inferior a cinco anos (que se relaciona com a seronegatividade visto que há mais probabilidade de que as crianças não tenham sido expostas) e altos níveis de imunossuppressores;^{22,23}
 - A curva da incidência de PTLD após TOS é bimodal, com um pico precoce e um tardio, sendo bastante frequente a sua apresentação passado um ano ou mais do transplante, o que se pode relacionar com o facto

destes doentes necessitarem de uma imunossupressão mais prolongada que os receptores de transplante de células hematopoiéticas.²⁴

- **Transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH):**

- PTLT em receptores de transplante alogénico de células estaminais ocorre sobretudo durante o primeiro ano após transplante (mais de 80% dos casos), particularmente nos primeiros cinco meses, altura em que a imunossupressão é mais forte e ainda não houve restabelecimento do sistema imunitário.²⁵ Outros factores de risco incluem: mais de 50 anos de idade na altura do transplante, depleção de linfócitos T do enxerto, uso de globulina anti-timócitos (ATG) e enxertos HLA-*mismatched*. Em doentes sem factores de risco, verificou-se que a incidência cumulativa era de cerca de 0,2% e em doentes com três ou mais factores de risco chega a 8,1%. A PTLT tardia (após o primeiro ano) costuma ser de origem em linfócitos T e pode não estar relacionada com EBV.¹³

Em ambos os casos a mortalidade é maior em doentes que desenvolvem PTLT nos primeiros seis meses pós-transplante, oscilando entre os 25% e os 48%.¹⁴

Alguns factores de risco são comuns aos TOS e aos de células estaminais. Por exemplo, cada vez mais se encontra evidência de que a presença e reactivação de outros vírus actuam como co-factores do EBV no desenvolvimento de PTLT, como por exemplo o Citomegalovírus (CMV) e o vírus da hepatite C (VHC).²⁶

Ainda, a doença de enxerto contra hospedeiro (DECH), tanto aguda como crónica, aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de PTLT. O risco aumenta com a gravidade da DECH, especula-se que seja devido ao enfraquecimento da resposta imunitária específica devido ao excesso de citocinas, sendo que a estimulação antigénica crónica característica da DECH e o uso de tratamentos profundamente imunossupressores também contribui para o desenvolvimento de PTLT.²⁷

A esplenectomia, frequentemente realizada em doentes com linfoma antes de ser submetidos a SCT, também foi identificada como um factor de risco.²⁸

Manifestações clínicas

A PTLD pós TOS pode manifestar-se de várias formas:

- Assintomática;
- Sinais e sintomas típicos de mononucleose infecciosa: ²⁹
 - Febre, faringite, linfadenopatias, mal-estar geral, perda de peso, sinusite crónica, hepatoesplenomegália, trombocitopénia e linfocitose atípica;
- Sinais e sintomas relacionados com o órgão ou sistema directamente afectado (podem surgir sintomas em qualquer órgão, embora haja uma tendência para ocorrer no local do enxerto): ²⁹
 - Hepatite – elevação das enzimas hepáticas, podendo ser acompanhadas por dor abdominal e icterícia;
 - Pneumonia – dispneia e tosse;
 - Sintomas gastrointestinais – dor abdominal, náuseas, vômitos, hemorragias gastro-intestinais, sintomas de perfuração intestinal;
 - Sistema nervoso central (SNC) – cefaleias e défices neurológicos focais;

Em doentes submetidos a transplante alogénico de células estaminais, a apresentação clínica de PTLD por EBV passa tipicamente por:

- Ausência de sintomas:
 - Doentes com infecção prévia por EBV tendem a ser inicialmente assintomáticos; ¹³
- Sinais e sintomas inespecíficos:
 - Febre, linfadenopatia generalizada, compromisso respiratório e aumento das transaminases, associando-se frequentemente a falência multiorgânica progressiva e morte. ¹³
- Sinais de compromisso de órgão:
 - As lesões podem ser ganglionares ou extra-ganglionares, frequentemente envolvendo o anel de Waldeyer, sistema gastrointestinal, fígado e SNC.
 - Tumores que surjam mais tardiamente após transplante, nomeadamente após um ano, são mais frequentemente localizados e indolentes. ¹³

Salienta-se portanto a extrema importância de um exame clínico adequado, passando por todos os sistemas, com particular atenção para com o sistema reticuloendotelial.³⁰ A pesquisa de massas ou adenopatias na naso/orofaringe, é fundamental não só para o diagnóstico precoce de PTLT, mas também pode apontar para o estágio de doença. Por exemplo, cerca de dois terços dos casos de hipertrofia das amígdalas está relacionado com doença precoce; por outro lado, massas extra-tonsilares representam sobretudo PTLT monomórfica.⁸

Exames complementares de diagnóstico

O percurso diagnóstico passa por:

Estudos radiográficos para identificar os locais de envolvimento, especialmente se os pulmões ou locais intra-abdominais estiverem afectados, através de teleradiografia de tórax (póstero-anterior e de perfil), que pode revelar lesões do parênquima pulmonar, infiltrados ou nódulos, e tomografia computadorizada (TC) do pescoço, tórax e abdómen para pesquisar lesões não identificáveis através do exame clínico, que deve ser realizada mal haja suspeita de PTLT ou para estadiamento após confirmação da doença.³⁰

Em caso de suspeita de envolvimento do SNC (cefaleias, sinais focais ou alterações visuais) é fundamental a realização de ressonância magnética (RM) crânio-encefálica. Alguns peritos sugerem a realização de RM ou TC em todos os doentes aquando da descoberta da doença para localizar potenciais lesões assintomáticas. Em doentes seleccionados pode-se recorrer a punção lombar para identificar o DNA do EBV no líquido cefalo-raquidiano (LCR) através de *polymerase chain reaction* (PCR). A biópsia do local de lesão é necessária para se estabelecer o diagnóstico definitivo de PTLT e para excluir outras infecções oportunistas que possam requerer uma terapêutica diferente;³¹

Visto que o sistema gastro-intestinal está frequentemente envolvido em PTLT, a endoscopia digestiva alta e colonoscopia precoces devem ser realizadas em doentes com dor abdominal inexplicada e diarreia, tendo em atenção que recipientes de transplante

gastro-intestinal podem relatar os mesmos sintomas em caso de rejeição ou infecção do enxerto por outros agentes;³¹

Recentemente têm surgido métodos de imagem que permitem fazer o diagnóstico e estadiamento com maior fiabilidade, como é o caso de *Fluorodeoxyglucose* (FDG)-*positron emission tomography* (PET), que permite a caracterização funcional de tecidos hipermetabólicos através da demonstração de maior captação de FDG nestes locais. Um estudo recente por Bakker *et al.* demonstrou que o uso desta técnica, já previamente usada na avaliação de doentes com linfomas agressivos, pode ser transposta para avaliação de doentes com PTLT, que com a sua capacidade de detectar localizações extraganglionares de PTLT frequentemente não discerníveis por outros métodos demonstra ser uma ferramenta valiosa nesta doença.³²

Exames Laboratoriais:

Deve-se proceder à colheita de sangue e avaliação do hemograma com plaquetas, electrólitos, cálcio, ureia: *blood urea nitrogen* (BUN) e creatinina, testes de função hepática, ácido úrico, lactato desidrogenase (LDH) e pesquisa de sangue oculto nas fezes. A partir destes exames pode-se revelar a existência de anemia, de envolvimento do sistema reticuloendotelial do fígado e baço, de lise tumoral devido ao rápido crescimento celular e ainda de hemorragias gastro-intestinais devido a lesões neoplásticas.

Através de citometria de fluxo, é possível identificar linfócitos T com antígenos específicos para EBV e monitorizar a reactivação de EBV pós-transplante, um indicador de maior risco de desenvolvimento de PTLT.³³

A medição da carga viral de EBV por PCR no sangue periférico revelou pouca especificidade em relação à predição de doença sistémica, no entanto existe uma correlação entre os níveis de DNA de EBV e a probabilidade de desenvolvimento de PTLT, sendo portanto útil usá-lo como monitorização dos doentes pós-transplante e como indicador da necessidade de pedir exames complementares de diagnóstico mais detalhados.^{34, 35}

Recomenda-se ainda medição da carga viral de CMV, que foi identificado como co-factor do crescimento tumoral em PTLT.^{36, 37}

O diagnóstico definitivo de PTLT requer biópsia com imunohistoquímica para EBNA-1 ou hibridização *in situ* com RNA de EBV, sendo esta última a ferramenta mais sensível para detectar vírus no tumor. Outras técnicas como LMP-1 *staining* com imunofluorescência costumam estar disponíveis na maior parte dos laboratórios clínicos, embora possam ocorrer falsos negativos na subpopulação de tumores que não expressa este antígeno.¹³

Rastreio de PTLT em doentes susceptíveis

A probabilidade de cura de PTLT é tanto maior quanto mais precoce for a detecção da doença. Assim, recomenda-se uma monitorização da carga viral de EBV dos doentes em risco, que embora não tenha a sensibilidade ou especificidade necessária para diagnosticar a doença, pode alertar para uma investigação mais pormenorizada.³¹

Como rastrear:

A quantificação de EBV por PCR é um método barato, sensível, rápido e acessível; no entanto, não existe ainda uma concordância inter-laboratorial acerca do procedimento, do tipo de amostras (linfócitos vs. sangue total vs. amostras de plasma) ou dos valores de referência.^{17, 26, 38}

A padronização dos valores de referência consoante o tipo de amostra é de particular importância, visto que diferentes amostras podem retratar situações distintas:

A pesquisa de carga viral de EBV em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) reflecte a quantidade de células infectadas pelo vírus, não distinguindo entre células normais e transformadas. Por outro lado, a carga viral no plasma reflecte DNA viral extracelular, libertado por células infectadas em fase lítica ou viriões libertados por células infectadas em produção viral. Uma carga viral elevada no sangue total pode resultar de qualquer uma destas três possibilidades. Em geral, análises com PBMC como fonte são as mais sensíveis; no

entanto, salienta-se que a presença de uma carga viral de EBV elevada nem sempre significa a existência de PTLT. ^{13, 39}

Quando rastrear:

É comum ocorrer, com o tempo, um aumento de DNA de EBV em doentes transplantados, e a detecção de carga viral de EBV em doentes de baixo risco tem pouca especificidade como biomarcador para o risco futuro de PTLT. Recomenda-se, contudo, o *screening* de carga viral de EBV durante o primeiro ano em doentes de alto risco (dador seropositivo com receptor seronegativo para EBV e CMV, assim como em doentes profundamente imunossuprimidos), monitorizando a carga viral semanalmente nos primeiros meses após o transplante e depois disso, mensalmente. ^{17, 37} Como está representado no gráfico abaixo (Fig. 2), a carga viral de EBV costuma subir antes do diagnóstico clínico de PTLT, o que permite uma intervenção preventiva em doentes de alto risco cujos níveis de EBV são rotineiramente monitorizados. O sucesso da intervenção é demonstrado pelo regresso dos níveis à linha basal.

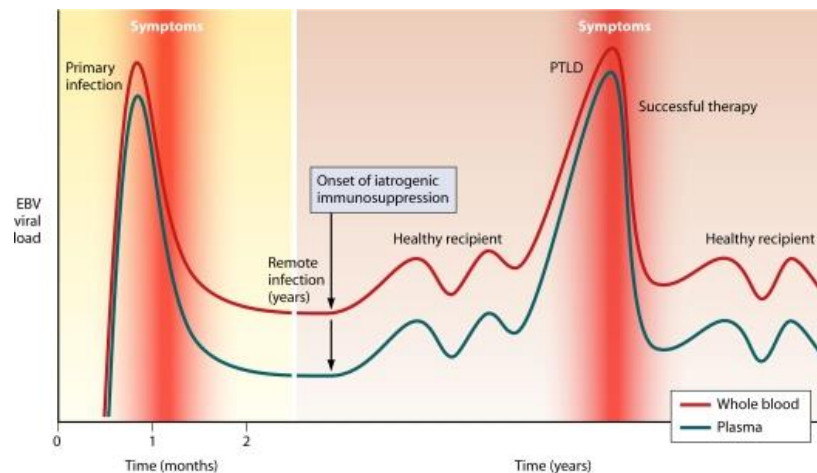


Fig. 2 – Evolução da carga viral de EBV em função do tempo, durante a infecção primária e após início de imunossupressão. ¹⁷

Existem poucos estudos acerca da monitorização da carga viral de EBV para além do primeiro ano, ainda que em certos tipos de transplante, tal como o transplante renal em adultos, a PTLT tenha tendência a manifestar-se mais tardiamente (mediana 74 meses após transplante). Nestes doentes, recomenda-se *screening* periódico de EBV em

receptores seronegativos, assim como pesquisa de sintomas e linfadenopatias para o resto da vida. No entanto, não há evidência que apoie a pesquisa de carga viral de EBV em grupos seropositivos de baixo risco, devendo o médico focar-se na pesquisa de sintomas e realização de exames clínicos de rotina, especialmente porque em casos tardios de PTLT e transplante renal, só cerca de 50% estão associados a EBV. ¹⁸

Terapêutica preventiva

Quando os níveis de DNA de EBV começam a aumentar para além do expectável, recomenda-se o estabelecimento de uma terapêutica preventiva na tentativa de evitar a ocorrência de PTLT.

Visto ainda não existir um consenso internacional acerca das medidas terapêuticas que devem ser efectuadas com função preventiva, foi elaborado em 2015 um estudo em que participaram 71 programas de TOS em 15 países da Europa, no qual se procurou averiguar quais as medidas preventivas actualmente em uso dirigidas para o PTLT relacionado a EBV. Averiguou-se que 97% dos centros avalia rotineiramente o estado serológico de EBV nos receptores de TOS e 90% tem acesso a análises de quantificação de EBV. Os tratamentos preventivos segundo a carga de EBV incluem a redução de imunossuppressores (50%), troca de medicamento para um inibidor da mTOR (30%) e uso de rituximab (15%). Cerca de 60% dos centros utiliza FDG-PET para descartar a presença de PTLT e 50% utiliza TC complementada. Ainda que sem evidência definitiva, a maioria dos centros usa a carga viral de EBV para guiar o percurso diagnóstico e a redução preventiva de imunossuppressores. Concluiu-se ainda que há necessidade de mais estudos prospectivos e controlados para definir o impacto da monitorização de EBV na redução do risco de PTLT em receptores de TOS. ⁴⁰

A diminuição da imunossupressão é normalmente a primeira medida efectuada quando existe suspeita da iminência de PTLT. Demonstrou-se que em recipientes de transplante hepático cuja imunossupressão é ajustada tendo em vista a carga viral, existe uma diminuição do risco de PTLT. ²² No entanto, esta medida pode desencadear uma resposta imunitária que cause rejeição do enxerto ou DECH.

Para contrariar estes efeitos nefastos da “descalagem” da imunossupressão, pode-se considerar o uso de um imunossupressor com efeito antiproliferativo para com as células tumorais, tal como um inibidor do m-TOR (everolimus ou rapamicina).⁴¹ Revelou-se que para além do efeito inibitório em células do sistema imunitário, a rapamicina também inibe a proliferação de células infectadas por EBV com transformação maligna.¹³ Um análogo da rapamicina, SDZ-RAD demonstrou um efeito ainda mais potente, com uma inibição profunda de linfócitos B EBV+, frenando a sua proliferação, mantendo-as no estágio G0/G1 da proliferação celular e aumentando a sua taxa de apoptose. Isto reflectiu-se numa desaceleração e até inibição do crescimento tumoral, e em alguns casos demonstrou-se capaz de erradicar o tumor já estabelecido.⁴²

Em recipientes de transplante cardíaco, a combinação de monitorização da carga viral de EBV e tratamento preventivo com rituximab mostrou uma diminuição da incidência de PTLD.²² Contudo, o rituximab causa uma depleção profunda de linfócitos B até cerca de 8 meses, pelo que a profilaxia com este fármaco deve ser reservada para doentes de alto risco para o desenvolvimento de PTLD.⁴³

O uso profilático de antivirais associa-se a uma redução de até 83% do risco de PTLD, dependendo do tipo de antiviral usado, sobretudo no primeiro ano pós-transplante. Num estudo recente, para cada 30 dias de tratamento com ganciclovir, verificou-se que o risco de PTLD no primeiro ano diminuía cerca de 38%, com resultados para aciclovir ligeiramente inferiores.⁴⁴ Os antivirais são já usados por vários centros de TOS em doentes de alto risco.¹¹

A infusão de linfócitos T autólogos ou alogénicos específicos para EBV ainda não é uma prática generalizada, contudo vários estudos atestam a sua segurança e eficácia na prevenção de PTLD.^{45, 24}

Está actualmente em estudo o desenvolvimento de uma vacina terapêutica contra doenças malignas relacionadas com EBV, cujo objectivo será o aumento do reconhecimento das células tumorais através dos antígenos virais por elas expressados. Foi realizado um estudo de fase 1 em doentes com carcinoma nasofaríngeo com resultados promissores, pelo que se planeia um estudo de fase 2.^{46, 47}

Tratamento

O tratamento de PTLT deve envolver uma equipa multidisciplinar composta por hemato-oncologistas, histopatologistas e radiologistas com experiência no tratamento de doentes transplantados e doenças linfoproliferativas agressivas. Podem necessitar ainda da intervenção de um cirurgião da equipa de transplantes, oncologistas, radiologistas, infecciosologistas ou médicos de cuidados paliativos. ⁴⁸

Antes do início da terapêutica deve-se proceder ao estadiamento completo do doente e à análise do seu estado geral e dos órgãos afectados através dos exames complementares já enunciados, assim como exames cardíacos (electrocardiograma e medição da fracção de ejeção) devido à toxicidade de alguns dos medicamentos usados.

As recomendações terapêuticas apresentadas são baseadas nas “Guidelines on the surveillance, diagnosis and management of post-transplant lymphoproliferative disorders in adult solid organ transplant recipients” produzidas sob a tutela do “British Committee for Standards in Haematology” (BCSH) e da “British Transplantation Society” (BTS) e apresentadas nas tabelas 1 e 2.

1. Redução da imunossupressão

A primeira medida terapêutica recomendada é a redução da imunossupressão (RI). A percentagem óptima de redução tendo em conta os possíveis efeitos adversos ainda não está definida, recomendando-se nas *guidelines* uma diminuição para os níveis mínimos tolerados (reduzindo cerca de 25-50% do normal) em todos os doentes com PTLT diagnosticada (Evidência Grau B, nível 3). ⁴⁸ Embora seja uma medida eficiente, sobretudo nos casos com doença precoce, deve-se considerar a velocidade de regeneração do sistema imunitário após paragem dos imunossupressores. Por exemplo, em casos de depleção profunda de linfócitos T, como é frequente após transplante de células estaminais hematopoiéticas, ou após tratamento com anticorpos específicos para linfócitos T, tais como OKT3 ou globulina antitimócitos (ATG), a reconstituição do sistema imunitário pode demorar semanas. Noutros casos, especialmente após TOS cuja

imunossupressão consiste sobretudo de inibidores de calcineurina e antimetabolitos, a recuperação é significativamente mais rápida.²²

Deve-se considerar também o risco de rejeição do transplante ou de DECH, que pode limitar a possibilidade de RI. No entanto, doentes seleccionados para quimioterapia podem tolerar um maior grau de RI, já que o próprio tratamento tem propriedades imunossupressivas.⁴⁹

Factores de risco para baixa resposta à RI são idade, dispneia, hepatite C crónica, um rácio de LDH aumentado, disfunção orgânica e envolvimento multiorgânico, devendo nestes doentes ser precocemente equacionada a administração de outro tipo de terapêutica.^{50, 51}

2. Cirurgia e radioterapia

No tratamento de PTLT localizada, a ressecção cirúrgica ou radioterapia pode ser a opção mais correcta, podendo só por si levar à cura completa. Num grupo de 30 doentes com PTLT localizada, o tratamento com ressecção local associada a RI teve uma alta taxa de sucesso, com apenas 27% de recidiva.⁵¹ Em doentes nos quais a ressecção possa levar à perda do órgão transplantado, deve-se procurar um tratamento alternativo tal como rituximab e/ou quimioterapia. (Evidência Grau C, nível 3).⁴⁸

3. Rituximab

Rituximab, um anticorpo monoclonal anti-CD20 tem sido usado em doentes com PTLT resistente à redução de imunossupressão ou cujo risco de desenvolvimento de DECH ou rejeição do enxerto constitua contraindicação para terapêutica de primeira linha, com uma percentagem de resposta em doentes submetidos a TOS entre os 44 e 100%.⁵² A taxa de resposta em receptores de TCEH varia entre os 70 e 100% em estudos diferentes com rituximab.⁵³

Ainda não está estabelecido quando iniciar rituximab após RI, embora haja um consenso de que não se deve esperar mais que 2-4 semanas. Se a progressão da doença for mais rápida, a terapêutica com rituximab deve ser iniciada o mais precocemente possível.^{22, 31} Para além da eficácia no tratamento da PTLT, o

rituximab tem a vantagem de se poder manter a imunossupressão durante o tratamento, evitando a rejeição do transplante ou DECH, e de não causar tantos efeitos adversos como a quimioterapia, cuja significativa toxicidade, atribuída não só às propriedades dos fármacos utilizados como também à imunossupressão e infecções resultantes pode resultar numa taxa de mortalidade relacionada com a terapêutica de 25%.⁴⁸ Outra vantagem do rituximab é não necessitar de ajuste de dose para disfunção cardíaca, pulmonar, hepática ou renal, o que é vantajoso em receptores de transplante.⁵⁴

Foram recentemente identificados como possíveis factores de má resposta ao rituximab: idade ≥ 30 anos, envolvimento de tecido extra-linfóide, DECH aguda e ausência de RI aquando do diagnóstico. Quantos mais factores de risco, maior a resistência ao Rituximab e consequentemente, maior a mortalidade: 0-1, 2, ou 3 factores estão associados a uma mortalidade de 7%, 37% e 72%, respectivamente.

⁵⁵

As *guidelines* recomendam monoterapia com rituximab em PTLT de baixo risco que não responde adequadamente a RI. O baixo risco define-se como idade < 60 anos, LDH elevado e um *performance status* segundo a *Eastern Cooperative Oncology Group* (E.C.O.G.) entre 2 e 4. (Tabela 3) (Evidência de grau B, nível 3)

⁴⁸

4. Quimioterapia

Não havendo ainda um consenso sobre qual a terapêutica a seguir em caso de PTLT resistente a rituximab, a quimioterapia com CHOP (Ciclofosfamida, doxorubicina (hidroxidaunorrubicina ou adriamicina), vincristina (oncovin) e Prednisolona) é apresentada como uma alternativa viável, existindo ainda a possibilidade de combinar a terapêutica de rituximab com quimioterapia (R-CHOP) em doentes com PTLT agressivos, o que tem dado resultados positivos em vários ensaios, constituindo já em vários centros terapêutica *standard* para doentes que não respondem a RI.^{22, 52, 56}

Recomenda-se quimioterapia baseada em antraciclinas mais rituximab em doentes com remissão inadequada após RI ou monoterapia com rituximab.

(Evidência Grau B, Nível 3) ⁴⁸ Em doentes diagnosticados com linfoma agressivo ou com compromisso grave da função de um ou mais órgãos, deve-se considerar iniciar imediatamente o tratamento com RI mais quimioterapia baseada em antraciclinas mais rituximab. (Evidência Grau C, Nível 4) ⁴⁸

Em casos de PTLT que afectem o SNC, o tratamento deve envolver RI seguido de radioterapia local mais corticoterapia, embora alguns doentes jovens e com bom estado geral se possa considerar tratamento com metotrexato em alta dose. (Evidência de grau C, nível 3) ⁴⁸

Também se pode considerar terapêutica com metotrexato em alta dose em doentes com PTLT recorrente sem resposta ao rituximab e R-CHOP, especialmente em doentes com linfoma de Burkitt. ⁵⁷

5. Imunoterapia

Vários estudos demonstram que a restauração do sistema imunitário anti-EBV através do transplante de linfócitos T específicos para EBV (CTL-EBV) é uma alternativa segura e eficaz no tratamento de PTLT. No entanto, a proliferação de CTL-EBV, seja alogénicos ou autólogos, demora cerca de oito a doze semanas, não constituindo uma alternativa terapêutica viável na maioria dos linfomas. Para contornar este problema propõe-se a criação de um banco de CTL-EBV. ²⁴ Outra alternativa seria o desenvolvimento destas células em doentes de alto risco logo após o transplante, para serem usadas profilaticamente ou guardadas em caso de desenvolvimento da doença. ⁵⁸

Estão actualmente em estudo outras técnicas que permitam um desenvolvimento rápido de CTL-EBVs, nomeadamente linfócitos T específicos para EBNA-1, cujo efeito antitumoral já foi confirmado em alguns ensaios. ⁵⁹

Actualmente, segundo as *guidelines*, o tratamento com linfócitos T específicos para EBV não está recomendado, excepto em ensaios clínicos. Aguardam-se futuros estudos sobre o uso de banco de linfócitos T autólogos ou alogénicos, (Evidência de grau C, nível 3) ⁴⁸

6. Terapêutica anti-viral

A razão pela qual os antivirais como ganciclovir não são eficazes no tratamento de PTLN relacionada com o EBV deve-se ao facto de terem como alvo certas proteínas expressas apenas durante o ciclo lítico do vírus. Visto que EBV, responsável pelo surgimento de linfomas nestes doentes, se encontra num estágio de latência, o tumor consegue evadir o tratamento com antivirais.¹³ Para contornar este problema, tem-se estudado métodos para conseguir a expressão de genes normalmente inactivos durante as fases de latência, de modo a tornar o vírus susceptível aos antivirais. Um destes métodos actualmente em desenvolvimento é a administração de butirato de arginina que activa o gene da tirosina cinase do EBV em células tumorais, permitindo a sua destruição com ganciclovir.^{60, 61} Outros métodos envolvem o uso de “small molecule inhibitors” para bloquear as vias de sinalização que estão constantemente activadas nas doenças malignas associadas ao EBV.⁴⁸

Actualmente, o tratamento com agentes antivirais e butirato de arginina não está recomendado pelas *guidelines* excepto em ensaios clínicos (Evidência de grau C, nível 3).⁴⁸

7. Agentes imunológicos

O IFN- α produz efeitos antivirais e melhora a função do sistema imunitário. Existem centros que adicionam o IFN- α à terapêutica de PTLN, embora acarrete um potencial risco de rejeição do enxerto. É difícil verificar a eficácia do IFN- α visto que é normalmente utilizado em conjunto com outras terapêuticas.⁴³

O tratamento com interferão ou imunoglobulina intravenosa não está recomendado pelas *guidelines* excepto em ensaios clínicos (Evidência de grau B, nível 3).⁴⁸

Prognóstico

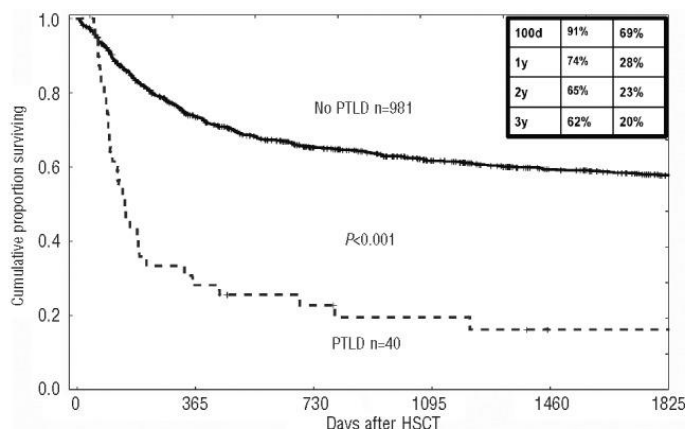


Fig.3 - Sobrevida cumulativa de doentes com (linha a tracejado) ou sem (linha contínua) PTLD diagnosticada. ⁴¹

Como se pode ver no gráfico acima (Fig. 3), o desenvolvimento de PTLD prejudica gravemente a sobrevivência dos doentes transplantados. Estima-se que 1,5% dos receptores de transplante venha a desenvolver PTLD, cerca de metade dos quais não sobreviverá para além do primeiro ano após o transplante. ⁶²

Embora seja difícil chegar a uma conclusão sobre quais os factores de mau prognóstico durante o tratamento de PTLD devido à falta de métodos padronizados de diagnóstico e de tratamento, identificaram-se algumas variáveis relacionadas com uma menor resposta à terapêutica e maior índice de mortalidade:

Segundo Allen *et al.* factores de mau prognóstico consistem num baixo *performance status* segundo a ECOG (Tabela 3), doença multisistémica, PTLD de linfócitos T ou NK, PTLD EBV-negativo, origem da PTLD nas células do recipiente e não do dador, coinfeção por vírus da hepatite B ou C, doença monoclonal e presença de mutação de proto-oncogenes ou genes supressores de tumores. ³⁰

Identificam-se ainda outros factores de mau prognóstico; segundo Ghobrial, a sobrevivência geral em doentes com PTLD pode ir desde os 25% aos 60%. Alguns factores de mau prognóstico identificados por este autor incluem, para além dos acima mencionados, a disfunção grave de órgão, presença de sintomas “B” (febre, suores nocturnos, perda de peso), idade avançada, estágio avançado, LDH elevado, afecção do

SNC, início tardio e doentes com transplante de medula após doença maligna oncológica.
50, 63

Análises estatísticas revelam também que o prognóstico em doentes pediátricos é melhor que o de adultos.¹¹

Conclusão

A PTLT representa uma complicação grave, embora rara, da imunossupressão associada ao transplante de órgão sólido ou de células estaminais hematopoiéticas, intimamente relacionada com a reactivação do vírus de Epstein-Barr. O conhecimento das formas de manifestação desta doença, assim como dos métodos de diagnóstico e rastreio disponíveis pode contribuir para uma prevenção e tratamento adequados, aumentando a probabilidade de cura destes doentes. Embora existam já guidelines para o tratamento desta patologia, têm surgido nos últimos 5 anos vários estudos comprovando a eficácia de novos medicamentos, que não se encontram ainda disponíveis ou difundidos pela maioria dos centros de tratamento. Salienta-se a necessidade uniformização das técnicas de monitorização da carga viral de EBV assim como dos valores de referência usados para implementação de estratégias preventivas ou terapêuticas.

Conflito de Interesses: A autora não tem conflito de interesses

Tabelas

Tabela I - Classificação dos níveis de evidência segundo o “British Committee for Standards in Haematology” (BCSH) e a “British Transplantation Society” (BTS) ⁴⁸

I.	a)	Evidência obtida através de meta-análises de ensaios aleatorizados controlados.
	b)	Evidência obtida através de pelo menos um ensaio controlado aleatorizado.
II.	a)	Evidência obtida através de pelo menos um ensaio bem desenhado e controlado não aleatorizado.
	b)	Evidência obtida através de pelo menos um outro tipo de ensaio quase-experimental bem desenhado
III.		Evidência obtida através de estudos bem desenhados não-experimentais descritivos, tais como estudos comparativos, estudos de correlação e case studies
IV.		Evidência obtida através de opiniões de comités de especialistas e/ou experiência clínica de autoridades respeitáveis.

Tabela II - Classificação dos graus de recomendação segundo o “British Committee for Standards in Haematology” (BCSH) e a “British Transplantation Society” (BTS) ⁴⁸

A.	Requer pelo menos um ensaio aleatorizado e controlado como parte de uma literatura de boa qualidade e consistência, abordando recomendações específicas	Níveis de Evidência Ia, Ib
B.	Requer a presença de estudos clínicos bem conduzidos, embora sem ensaios clínicos aleatorizados no tópico de recomendações.	Níveis de evidência IIa, IIb, III
C.	Requer evidência obtida de relatórios de comités de especialistas ou opiniões e/ou experiências clínicas de autoridades respeitáveis. Indica a ausência de ensaios clínicos de boa qualidade.	Nível de evidência IV

Tabela 3 - Performance status segundo a “Eastern Cooperative Oncology Group” (ECOG) ⁶⁴

GRADE	ECOG PERFORMANCE STATUS
0	Totalmente activo, capaz de desempenhar todas as actividades pré-doença sem restrições.
1	Restrições em actividades vigorosas, em regime de ambulatório e capaz de desempenhar tarefas de natureza leve ou sedentária (tarefas domésticas, trabalho de escritório)
2	Em regime de ambulatório e capaz de autonomia nos cuidados pessoais, embora sem capacidade de desempenhar quaisquer tarefas laborais. Desperto e activo em mais de 50% do dia.
3	Limitado nos auto-cuidados, confinado ao leito ou cadeirão mais de 50% do dia.
4	Completamente incapacitado, sem qualquer autonomia nos cuidados pessoais, totalmente confinado ao leito ou cadeirão.
5	Morte

Referências Bibliográficas

-
- ¹ Hislop, A. (2015). Early virological and immunological events in Epstein–Barr virus infection. *Current Opinion in Virology* 25: 75-79.
- ² Mesri, E. A., Feitelson, M., & Munger, K. (2014). Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host & Microbe* 15(3):266–282.
- ³ White, M. K., Pagano, J. S., & Khalili, K. (2014). Viruses and human cancers: a long road of discovery of molecular paradigms. *Clinical Microbiology Reviews* 27(3):463–481.
- ⁴ Capello, D., & Gaidano, G. (2009). Post-transplant lymphoproliferative disorders: role of viral infection, genetic lesions and antigen stimulation in the pathogenesis of the disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 1(2):1-30.
- ⁵ Grywalska, E., & Rolinski, J. (2015). Epstein-Barr virus–associated lymphomas. *Seminars in Oncology* 42(2):291-303.
- ⁶ Petrara, M., Giunco, S., Serraino, D., Dolcetti, R., & Rossi, A. (2015). Post-transplant lymphoproliferative disorders: From epidemiology to pathogenesis-driven treatment. *Cancer Letters* 369(1):37-44.
- ⁷ Ibrahim, H., & Naresh, K. (2012). Posttransplant lymphoproliferative disorders. *Advances in Hematology* 2012:1-29.
- ⁸ Akbas, A., Tiede, C., Lemound, J., Maecker-Kolhoff, B., Kreipe, H., & Hussein, K. (2015). Post-transplant lymphoproliferative disorders with naso- and oropharyngeal manifestation. *Transplant International* 28(11):1299-307.
- ⁹ Cesarman, E. (2011). Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Letters* 305(2):163–174.
- ¹⁰ Hertig, A., & Zuckermann, A. (2015). Rabbit antithymocyte globulin induction and risk of post-transplant lymphoproliferative disease in adult and pediatric solid organ transplantation: An update. *Transplant Immunology* 33(3):179-187.
- ¹¹ Mynarek, M., Schober, T., Behrends, U., & Maecker-Kolhoff, B. (2013). Posttransplant lymphoproliferative disease after pediatric solid organ transplantation. *Clinical and Developmental Immunology* 2013:1-14.
- ¹² Luskin, M. R., Heil, D. S., Tan, K. S., et al. (2015). The impact of EBV status on characteristics and outcomes of posttransplantation lymphoproliferative disorder. *American Journal of Transplantation* 15:2665–2673.
- ¹³ Reddy, N., Rezvani, K., Barrett, A., & Savani, B. (2010). Strategies to prevent EBV reactivation and posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after allogeneic stem cell transplantation in high-risk patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17(5):591-597.

-
- ¹⁴ Marques, H., Shikanai-Yasuda, M., Azevedo, L., et al. (2014). Management of post-transplant Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disease in solid organ and hematopoietic stem cell recipients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47(5):543-546.
- ¹⁵ Locke, J., & Singer, A. (2011). Evolving concepts in the selection of immunosuppression regimen for liver transplant recipients. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 3:53-62.
- ¹⁶ Uhlin, M., Wikell, H., Sundin, M., et al. (2013). Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 99(2):346-352.
- ¹⁷ Gulley, M., & Tang, W. (2010). Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2):350-366.
- ¹⁸ Morton, M., Coupes, B., Roberts, S., et al. (2014). Epstein-Barr Virus infection in adult renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 14(7):1619-1629.
- ¹⁹ Kawada, J., Ito, Y., Iwata, S., et al., (2014). MTOR inhibitors induce cell-cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma cells. *Clinical Cancer Research* 20:5412-5422.
- ²⁰ Ashrafi, F., Shahidi, S., & Ebrahimi, Z. (2014). outcome of rapamycin therapy for post-transplant-lymphoproliferative disorder after kidney transplantation: case series. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 9(1):26-32.
- ²¹ Kanakry, J. A., Kasamon, Y. L., Bolaños-Meade, J., et al., (2013). Absence of posttransplantation lymphoproliferative disorder after allogeneic blood or marrow transplantation using posttransplantation cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 19(10):1514–1517.
- ²² Zimmermann, H., & Trappe, R. (2013). EBV and posttransplantation lymphoproliferative disease: What to do? *American Society of Hematology Education Book* 2013(1): 95-102.
- ²³ Yang, Y., Yu, B., & Chen, Y. (2015). Blood disorders typically associated with renal transplantation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology Front* 3(18): 1-12.
- ²⁴ Tse, E., & Kwong, Y. (2015). Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Experimental & Molecular Medicine* 47(1): e136, 1-7.
- ²⁵ Curtis, R., Travis, L., & Rowlings, P. (1999). Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: A multi-institutional study. *Blood* 94:2208-2216.
- ²⁶ Preiksaitis, J. (2004). New developments in the diagnosis and management of posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 39(7):1016-1023.

-
- ²⁷ Landgren, O., Gilbert, E., Rizzo, J., et al., (2009). Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 113(30):4992-5001.
- ²⁸ Sundin, M., Le Blanc, K., Ringden, O., et al., (2006). The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient epstein-barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 91(8):1059-1067.
- ²⁹ Allen, U., & Preiksaitis, J. (2009). Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 9(S4):S87-S96-S87-S96.
- ³⁰ Pedersen, M., & Seetharam, A. (2014). infections after orthotopic liver transplantation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 4(4):347-360.
- ³¹ Green, M., & Michaels, M. (2013). Epstein-Barr Virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *American Journal of Transplantation* 13(3):41-54.
- ³² Bakker, N., Pruim, J., Graaf, W., Son, W., Jagt, E., & Imhoff, G. (2006). PTLTD Visualization by FDG-PET: Improved detection of extranodal localizations. *American Journal of Transplantation* 6(8):1984-1985.
- ³³ Maguire, O., Tario, J., Shanahan, T., Wallace, P., & Minderman, H. (2014). flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match. *Immunological Investigations* 43(8):756-774.
- ³⁴ Stevens, S. (2001). Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 97(5):1165-1171.
- ³⁵ Holman, C., Karger, A., Mullan, B., Brundage, R., & Balfour, H. (2012). Quantitative Epstein-Barr virus shedding and its correlation with the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clinical Transplantation* 26(5):741-747.
- ³⁶ Neuringer, I. (2015). Posttransplant lymphoproliferative disease after lung transplantation. *Clinical and Developmental Immunology* 2013:1-11.
- ³⁷ Zallio, F., Primon, V., Tamiazzo, S., et al., (2013). Epstein-Barr virus reactivation in allogeneic stem cell transplantation is highly related to cytomegalovirus reactivation. *Clinical Transplantation* 27(4):491-497.
- ³⁸ Tellez, J., Jaing, C., Wang, J., Green, R., & Chen, M. (2014). Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in human lymphoma tissue by a novel microbial detection array. *Biomarker Research* 2:24.
- ³⁹ Kamdar, K., Rooney, C., & Heslop, H. (2012). Post-transplant lymphoproliferative disease following liver transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 16(13):274-280.
- ⁴⁰ San-Juan, R., Manuel, O., Hirsch, H., et al., (2015). Current preventive strategies and management of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ

transplantation in Europe. Results of the ESGICH questionnaire-based cross-sectional survey. *Clinical Microbiology and Infection* 21(6):601-604.

⁴¹ Schrem, H., Barg-Hock, H., Strassburg, C., Schwarz, A., & Klempnauer, J. (2009). Aftercare for Patients With Transplanted Organs. *Deutsches Ärzteblatt International* 106(9):148-156.

⁴² Majewski, M., Korecka, M., Kossev, P., et al. (2000). The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(8):4285-4290.

⁴³ Bennett, J., Dolin, R., and Blaser, M. Epstein Barr virus (infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus-associated malignant diseases, and other diseases) 2015. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Vol. 2. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 1754-1771.

⁴⁴ Funch, D., Walker, A., Schneider, G., Ziyadeh, N., & Pescovitz, M. (2005). Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 5(12):2894-2900.

⁴⁵ Rooney, C., Smith, C., Ng, C., et al. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *American Society of Hematology Education Book* 92(5):1549-1555.

⁴⁶ Balfour, H. (2014). Progress, prospects, and problems in Epstein-Barr virus vaccine development. *Current Opinion in Virology*, 0:1-5.

⁴⁷ Kanakry, J., & Ambinder, R. (2013). EBV-related lymphomas: new approaches to treatment. *Current Treatment Options in Oncology* 14(2):224-236.

⁴⁸ Parker, A., Bowles, K., Bradley, J., et al., (2010). Management of post-transplant lymphoproliferative disorder in adult solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines. *British Journal of Haematology* 149(5):693-705.

⁴⁹ Taylor, E., Jones, M., Hourigan, M., et al., (2015). Cessation of immunosuppression during chemotherapy for post-transplant lymphoproliferative disorders in renal transplant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 30(10):1774-1779.

⁵⁰ Tsai, D., Hardy, C., Tomaszewski, J., et al., (2001). Reduction in immunosuppression as initial therapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: analysis of prognostic variables and long-term follow-up of 42 adult patients. *Transplantation* 71(8):1076-1088.

⁵¹ Reshef, R., Vardhanabhuti, S., Luskin, M., et al., (2011). Reduction of Immunosuppression as Initial Therapy for Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *American Journal of Transplantation* 11(2):336-347.

⁵² Kuriyama, T., Kawano, N., Yamashita, K., & Ueda, A. (2014). Successful treatment of rituximab-resistant Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder using R-CHOP. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 54(2):149-153.

-
- 53 Gottschalk, S., Rooney, F., & Heslop, H. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annual Review of Medicine* 56:29-44.
- 54 Svoboda, J., Kotloff, R., & Tsai, D. (2006). Management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder: The role of rituximab. *Transplant International* 19(4):259-269.
- 55 Styczynski, J., Gil, L., Tridello, et al., (2013). Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in Epstein Barr Virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the infectious diseases working party of the european gro. *Clinical Infectious Diseases* 57(6):794-802.
- 56 Karbasi-Afshar, R., & Taheri, S. (2013). Rituximab is indispensable for pediatric heart transplant recipients developing post transplant lymphoproliferative disorders. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 3(3):125-134.
- 57 Twist, C., & Castillo, R. (2013). Treatment of recurrent posttransplant lymphoproliferative disorder of the central nervous system with high-dose methotrexate. *Case Reports in Transplantation*, 2013:1-4.
- 58 Styczynski, J., Reusser, P., Einsele, H., et al., (2008). Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: Guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant Bone Marrow Transplantation* 43:757-770.
- 59 Kalra, M., & Gottschalk, S. (2013). Targeting EBV's Achilles' heel with antigen-specific T cells. *Immunotherapy* 5(4):353-355.
- 60 Mentzer, S., Perrine, S., & Faller, D. (2001). Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: Pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate. *Transplant Infectious Disease* 3(3):177-185.
- 61 Faller, D., Mentzer, S., & Perrine, S. (2001). Induction of the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene with concomitant nucleoside antivirals as a therapeutic strategy for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Current Opinion in Oncology* 13(5):360-367
- 62 Khan, G., & Hashim, M. J. (2014). Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. *Infectious Agents and Cancer* 9:38.
- 63 Ghobrial, I. (2005). Prognostic analysis for survival in adult solid organ transplant recipients with post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Journal of Clinical Oncology* 23(30):7574-7582.
- 64 Oken, M., Creech, R., Tormey, D. et al. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology* 5(6):649-656